PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/32014
G01N 33/50, 33/68, 33/566, 33/58, 1/30	A1	(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. Juli 1998 (23.07.98)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/00251

(22) Internationales Anmeldedatum: 20. Januar 1997 (20.01.97)

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: ORPEGEN PHARMA GMBH [DE/DE]; Czerny-Ring 22, D-69115 Heidelberg (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: NEBE, Carl, Thomas [DE/DE]; August-Frey-Weg 5, D-68526 Ladenburg (DE). HARTMANN, Karin [DE/DE]; Erlenweg 13, D-67158 Ellerstadt (DE).

(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: DE, GB, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: BASOPHIL DEGRANULATION TEST

(54) Bezeichnung: BASOPHILEN-DEGRANULATIONSTEST

(57) Abstract

A process is disclosed for determining the degranulation activity of basophilic granulocytes in a sample, as well as a reagent kit appropriate to implement the process. Also disclosed is a process for diagnosing allergic hypersensitivity and controlling the success of a hyposensitising therapy.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Degranulationsaktivität von basophilen Granulozyten in einer Probe sowie ein dazu geeignetes Reagenzienkit. Weiterhin betrifft die Erfindung auch ein Diagnoseverfahren auf allergische Hypersensibilität und die Erfolgskontrolle einer Hyposensibilisierungstherapie.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Basophilen-Degranulationstest

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Degranulationsaktivität von basophilen Granulozyten in einer Probe sowie ein dazu geeignetes Reagenzienkit. Weiterhin betrifft die Erfindung auch ein Diagnoseverfahren auf allergische Hypersensibilität und den Erfolg einer Hyposensibilisierung.

Die klassische Einteilung der Allergien nach Coombs und Gell gilt heute noch weitgehend als Grundlage zum Verständnis der allergischen Typ-1-Reaktion vom Soforttyp und ist klar definiert durch eine IgE-vermittelte Immunantwort. Dabei spielen T-Zellen mit einem bestimmten Zytokinmuster (Interleukin-4 und -5) eine besondere Rolle. B-Lymphozyten werden dadurch zu einer Umschaltung auf IgE-Produktion bewegt, welches nur in sehr niedrigen Spiegeln im Serum vorkommt und erst nach Zellbindung über hochaffine Rezeptoren durch deren Degranulation der Zellen seine fatale Wirkung entfaltet. Die Zytokine, insbesondere Interleukin-5, bewirken außerdem eine vermehrte Ausreifung von Promyelozyten in eosinophile Granulozyten, die durch die Freisetzung toxischer Proteine aus ihren Granula Spätschäden insbesondere am Bronchialsystem verursachen. Die physiologische Bedeutung der Typ-I-Allergie ist noch völlig unklar, ebenso wie die Ursache, warum die T-Zellen ein Zytokinmuster für eine IgE-Antwort sezernieren.

Die Bestimmung von spezifischen IgE-Antikörpern im Serum (RAST, CAP u.ä.) ist gut etabliert und insbesondere dann hilfreich, wenn bekannte Allergene zu prüfen sind oder wenn eine Hauttestung gefährlich oder technisch nicht möglich ist, wie z. B. bei Hauterkrankungen oder unter Medikamenteneinfluß. Allergene werden dabei kovalent oder mit hoher Affinität an Matrices mit großer Oberfläche (Schwämmchen, Kügelchen, Pa-

pierscheiben) gebunden, anschließend mit Patientenserum inkubiert und dann nach Waschen wird eine Detektion mit einem radioaktiven oder enzymmarkierten anti-human-IgE-Antikörper durchgeführt. Die Menge des gebundenen IgE wird semiquantitativ in sog. RAST- bzw. CAP-Klassen oder quantitativ in kU IgE/l angegeben. Die Auswertung kann radiometrisch (RAST) oder z. B. fluorimetrisch (CAP, Enzym mit fluorogenem substrat) erfolgen.

Die Vorteile dieses Tests sind die leichte Durchführbarkeit und eine gute Korrelation mit dem Goldstandard Hauttest bei Aeroallergenen bzw. den sog. Atopenen. Allerdings müssen dafür schwerwiegende Nachteile in Kauf genommen werden. Diese Nachteile sind z. B. die mangelnde Verfügbarkeit von seltenen Allergenen und oft die Epitopveränderungen durch Kopplung der Allergene an die Matrix. Außerdem wird bei kleineren Allergenen (Haptenen) ein Carriermolekül wie z. B. humanes Serumalbumin benötigt. Weitere Schwierigkeiten werden dadurch verursacht, daß die Spezifitäten von Serum-IgE und membrangebundenem IgE auf Basophilen und Mastzellen nicht übereinstimmen müssen, da nur ein langsamer Austausch stattfindet. Auch wird die Schwelle der Degranulationsbereitschaft (releasability) nicht erfaßt. Die Korrelation mit dem Erfolg einer Hyposensibilisierung in Form eines IgE-Rückgangs ist nur bei Insektengiftallergenen einigermaßen befriedigend, d.h. in der Mehrzahl der Fälle fehlt die Erklärung. Weiterhin muß bei Atopikern mit hohem IgE-Spiegel eine Relativierung der spezifischen IgE-Werte erfolgen, d.h. der Gesamt-IgE Spiegel des Patienten muß bekannt sein. Die Schwere des Krankheitsbildes korreliert kaum mit der Höhe des spezifischen IgE-Spiegels.

Als vereinfachte Version dieses Verfahrens sind fertige Teststreifen entwickelt worden, auf denen verschiedenen Allergene aufgebracht sind. Die Auswertung erfolgt durch Vergleich der entstehenden Blaufärbung mit einer Farbskala. Inhalationsantigene, die eine Reaktion in den höheren RAST-Klassen erzeugen, werden gut erkannt. Ansonsten liegen wenig Vergleichsdaten

vor. Der Test ist in erster Linie für niedergelassene Allergologen ohne größeres eigenes Labor gedacht.

Aufgrund der vorstehend genannten Probleme bei der Bestimmung von spezifischem Serum-IgE wurden Tests entwickelt, bei denen nach einer Stimulation mit einem Allergen eine Degranulation der basophilen Granulozyten bewirkt wird und danach die freigesetzten Inhaltsstoffe der Granula im Überstand bestimmt werden. Derartige Inhaltsstoffe sind z. B. Histamin (Fa. Immunotech, Fa. IBL), Leukotriene (CAST-ELISA, Fa. Biermann) oder Tryptase (Fa. Pharmacia). Diese Assays sind ausgelegt als Enzymimmunoassay im Batchverfahren und erfordern aufgrund von Inkubationsschritten über Nacht eine Dauer von zwei Tagen. Ein weiterer Nachteil in Bezug auf die Histaminbestimmung ist der Acylierungsschritt für das freigesetzte Histamin sowie ein oftmals überhöhter Histamingehalt der Allergenlösungen durch bakterielle Verunreinigungen. Weiterhin ist es aus wirtschaftlichen Gesichtspunkten erforderlich, die Überstände mehrerer Patienten zu sammeln, wodurch es zu einer Befundverzögerung kommt. Die Degranulation muß jedoch noch am Abnahmetag aus frischem Vollblut erfolgen.

Es hat daher bereits Versuche gegeben, die Degranulation zytometrisch nachzuweisen. In einem Ansatz wurde die Absorption von basophilen Granula mit einem Technicon H6000 Meßgerät bestimmt. Dabei werden am Bildschirm die Meßpunkte von Hand ausgezählt (Nilsson, Eur. J. Haematol, 45 suppl 53, 50-54, 1990). Alternativ erfolgt eine Messung des axialen Lichtverlusts nach Färbung mit Toluidinblau in einem Ortho Cytofluorographen (Nakagawa et al. (Allergy 36, 39-47, 1981). Ein weiterer Ansatz besteht darin, ein durchflußzytometrisches Zweifarben-Immunfluoreszenzverfahren durchzuführen, wobei unterschiedlich markierte anti-CD45- und anti-IgE-Antikörper verwendet werden (Gane et al., Cytometry 19, 361-365, 1995). Dieses Verfahren beruht auf einer relativen Erhöhung der Expressionsdichte von CD45 und einer Verringerung der IgE-Antikörperexpression bei Degranulation. Dieses Verfahren hat jedoch

den Nachteil, daß die Änderung der CD45 Expressionsdichte nur gering ist.

Keines dieser zytometrischen Verfahren hat aufgrund der genannten Nachteile bisher Eingang in die Routine gefunden, da sie an bestimmte, nicht allgemein verfügbare Geräte gebunden sind oder die Signalunterschiede sehr gering sind. Ferner ist die Messung der Basophilen schwierig, da sie im Blut selten sind und allein aufgrund der Streulichteigenschaften nur schwer von den anderen Leukozyten unterschieden werden können.

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegenden Aufgabe bestand somit darin, ein neues Verfahren zur Bestimmung der Degranulationsaktivität von basophilen Granulozyten bereitzustellen, das einfach und rasch durchzuführen ist und mit herkömmlichen Durchflußzytometern, die in Krankenhäusern bzw. den Laborpraxen weitverbreitet sind, ausgeführt werden kann.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Bestimmung der Degranulationsaktivität von basophilen Granulozyten in einer Probe, wobei man

a) die Probe mit einer Testsubstanz vermischt und inkubiert,
b) die Probe mit einem ersten Bindemolekül, das mit zellständigen IgE-Antikörpern oder deren hochaffinen Rezeptoren bindefähig ist, und einem zweiten Bindemolekül, das mit einem Oberflächenmolekül, welches bei Degranulation de novo an der Oberfläche von basophilen Granulozyten erscheint, bindefähig ist, vermischt und inkubiert, wobei das erste Bindemolekül und das zweite Bindemolekül unterschiedliche nebeneinander nachweisbare Markierungsgruppen tragen oder jeweils mit unterschiedlichen nebeneinander nachweisbaren Markierungsgruppen bindefähig sind, und
c) die Markierungen der Bindemoleküle separat bestimmt und auf Basis dieser Bestimmung die Degranulationsaktivität in der Probe qualitativ oder/und quantitativ ermittelt.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden zunächst die Basophilen über die Markierung mit einem ersten spezifischen Bindemolekül, z. B. einem Antikörper eindeutig bestimmt. Dieses erste Bindemolekül bindet an zellständige IgE-Antikörper oder deren hochaffinen Rezeptoren. Nur Basophile besitzen eine hohe Oberflächendichte an IgE-Molekülen, die gebunden an hochaffine Rezeptoren ($Fc_\epsilon R1$) vorliegen. Vorzugsweise werden solche IgE- oder Rezeptor-spezifischen Antikörper verwendet, die nicht zu einer Vernetzung des IgE führen.

Die Besonderheit des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht weiterhin darin, daß ein zweites Bindemolekül verwendet wird, das mit einem erst durch die Degranulation an der Oberfläche erscheinenden Antigen (de novo-Expression) bindefähig ist. Ein Beispiel für ein solches Antigen ist das präformierte lysosomale Protein gp55, das erst durch die Fusion der Granulamembran mit der Cytoplasmamembran im Rahmen der Degranulation an der Oberfläche erscheint und dort nachgewiesen werden kann.

Mit dem Begriff "Testsubstanz" wird in der vorliegenden Erfindung jedes Molekül verstanden, das eine Aktivierung von basophilen Granulozyten bzw. die Degranulation hervorrufen kann. Im allgemeinen ist die Testsubstanz ein Allergen wie etwa Pflanzenpollen, ein Insektengift, wie etwa Bienen- oder Wespengift, ein Medikament, wie etwa Penicillin oder ein Latexallergen. Außerdem werden mit "Testsubstanz" auch andere biologische und synthetische Substanzen bezeichnet, die eine derartige Aktivierung hervorrufen können und im Sinne einer Positivkontrolle verwendet werden können. Ein Beispiel dafür ist das chemotaktische Peptid fMLP.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Probe mit einem die Degranulationsaktivität verstärkenden Stimulans, z. B. einem Zytokin vorinkubiert. Die Menge des Zytokins beträgt vorzugsweise 0,1-100 ng pro Ansatz. Diese Vorinkubation führt zur einer Sensibilisierung der basophilen Granulozyten, wodurch die Schwelle der Degranulationsbereit-

schaft (releasability) herabgesetzt wird. Das verwendete Stimulans ist vorzugsweise ein Lymphokin wie etwa ein Interleukin oder ein Wachstumsfaktor wie etwa ein koloniestimulierender Faktor (CSF). Bevorzugt sind IL-3 oder GM-CSF. Die Vorinkubation mit dem Zytokin erfolgt üblicherweise vor Schritt (a) des erfindungsgemäßen Verfahrens d. h. vor der Zugabe des Allergens, kann jedoch auch gleichzeitig der Allergen-Inkubation durchgeführt werden.

Die Inkubation mit einem Allergen als Testsubstanz führt bei einer aus einem Allergiepatienten stammenden Probe zu einer Aktivierung der basophilen Granulozyten und somit zu einer Degranulation, deren Ausmaß mit dem Ausmaß der allergischen Reakion korreliert. Das erste Bindemolekül dient zur Definition der basophilen Granulozyten, und das zweite Bindemolekül dient zur Definition desjenigen Anteils an basophilen Granulozyten, bei dem eine Degranulation stattgefunden hat. Der relative Anteil der degranulierten Granulozyten kann somit auf einfache Weise bestimmt werden durch das Verhältnis der Zellen, die für das erste und zweite Bindemolekül positiv sind, zu den Zellen, die lediglich für das erste Bindemolekül positiv sind.

Das vom zweiten Bindemolekül erkannte Antigen ist üblicherweise ein Protein oder ein Glykoprotein, das erst aufgrund der Degranulation an der Oberfläche erscheint und somit eine eindeutige Unterscheidung zwischen degranulierten und nichtdegranulierten Granulozyten erlaubt. Bevorzugt ist das Oberflächenmolekül gp55.

Als erstes und zweites Bindemolekül können beliebige biologische Substanzen verwendet werden, sofern sie eine spezifische Bindung entweder mit IgE-Antikörpern oder deren hochaffinen Rezeptoren bzw. einem degranulationsspezifischen Oberflächenmolekül zeigen. Vorzugsweise werden als erstes oder/und zweites Bindemolekül ein Antikörper oder ein Antikörperfragment verwendet. Dabei sind monoklonale Antikörper bevorzugt,

jedoch auch polyklonale Antikörper sind geeignet. Insbesondere für das erste Bindemolekül sind solche Antikörper oder Antikörperfragmente geeignet, die eine hohe Spezifität, aber geringe Vernetzungs- bzw. Degranulationseigenschaften aufweisen (z. B. Fab-Fragmente). Antikörper oder Antikörperfragmente gegen den Fc_ϵ-Rezeptor sind besonders als erste Bindemoleküle geeignet, da bei einem geringen Teil der Patienten die Zellen durch anti-IgE nur unzureichend erkannt bzw. aktiviert werden.

Weiterhin ist es im erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugt, nach einer definierten Inkubationsdauer mit dem Allergen und dem ersten und zweiten Bindemolekül die Degranulation abzustoppen. Dies kann z. B. durch eine Fixierung der Leukozyten erfolgen. Weiterhin ist es bevorzugt, nach der Inkubation die Erythrozyten zu lysieren. Eine Lyse der Erythrozyten und Fixierung der Leukozyten kann gegebenenfalls auch in einem Schritt erfolgen. So wird der Probe eine Lösung zugegeben, die beispielsweise eine hohe Konzentration von Ammoniumchlorid sowie ETDA enthält. Geeignet sind auch Lösungen, die Formaldehyd und/oder die Ethylengylykol enthalten. Eine bevorzugte Lösung zur Durchführung der Lyse und Fixierung ist eine unter der Handelsbezeichnung FACS-Lysing Solution (Becton Dickinson) kommerziell erhältliche Lösung. Gegebenenfalls wird im Anschluß an die Fixierung ein Waschschritt durchgeführt.

Neben der Bestimmung von IgE und de novo exprimiertem Oberflächenmolekül kann das erfindungsgemäße Verfahren auch die Bestimmung eines oder mehrerer zusätzlicher Parameter umfassen. So kann man die Probe zusätzlich mit einem dritten Bindemolekül inkubieren, das mit dem Oberflächenmolekül CD45 bindefähig ist, wobei das dritte Bindemolekül eine Markierungsgruppe trägt oder mit einer Markierungsgruppe bindefähig ist, die separat neben den Markierungsgruppen des ersten und zweiten Bindemoleküls nachweisbar ist. Das dritte Bindemolekül ist vorzugsweise ein anti-CD45-Antikörper oder ein Fragment eines derartigen Antikörpers.

Durch zusätzliche Bestimmung von CD45, das nach Aktivierung der basophilen Granulozyten verstärkt exprimiert wird, kann die Genauigkeit der Bestimmung weiter erhöht werden.

Ebenfalls ein weiterer Parameter, der im erfindungsgemäßen Verfahren bestimmt werden kann, ist das Seitwärtsstreulicht, welches bei der Degranulation von Basophilen zunimmt.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Bindemoleküle können eine Markierungsgruppe tragen oder mit einer Markierungsgruppe bindefähig sein. Wenn das Bindemolekül eine Markierungsgruppe trägt, d. h. direkt markiert ist, liegt es vorzugsweise als kovalentes Konjugat mit der Markierungsgruppe vor. Andererseits kann das Bindemolekül auch indirekt markiert sein, d. h. es trägt selbst direkt keine nachweisbare Markierungsgruppe sondern kann an eine weitere Substanz binden, die die Markierungsgruppe trägt. Beispiele für indirekt markierte Bindemoleküle sind Hapten-gekoppelte Antikörper, die mit einem eine Markierungsgruppe tragenden anti-Hapten-Antikörper bindefähig sind. Die Kopplung von Markierungsgruppen und Haptenen an biologische Bindemoleküle, insbesondere Antikörper oder Antikörperfragmente, ist dem Fachmann auf dem Gebiet immunologischer Testverfahren bekannt und braucht daher nicht näher erläutert zu werden. Für das erfindungsgemäße Verfahren sind direkt markierte Bindemoleküle bevorzugt.

Als Markierungsgruppen für die Bindemoleküle sind im wesentlichen alle auf dem Gebiet diagnostischer Nachweisverfahren bekannten Markierungen geeignet, wobei die einzige Voraussetzung darin besteht, daß die einzelnen verwendeten Markierungen nebeneinander bestimmbar sind. Bevorzugt sind Fluoreszenzmarkierungen mit jeweils einem unterschiedlichen spektralen Emissionsspektrum, z. B. Fluorescein, Phycoerythrin (PE) und Peridinium-Chlorophyll-A-Protein (Per CP) oder ein PE-Cyanin 5 Tandemkonjugat (z. B. Cychrome). Die Bestimmung wird bevorzugt in einem Durchflußzytometer ausgeführt.

Gemäß einer anderen bevorzugten Ausführungsform des vorliegenden Verfahrens wird als weiterer Parameter ein DNA-Farbstoff, der neben den Markierungen von anti-IgE-Antikörper und Rezeptor bestimmbar ist, zugegeben und bestimmt. Der DNA-Farbstoff dient zur Anfärbung der Zellkerne und somit dem Ausschluß von Thrombozyten und unlysierten Erythrozyten. Bevorzugt ist ein Fluoreszenzfarbstoff wie etwa 7-Aminoactinomycin D oder Propidiumjodid. Besonders bevorzugt ist 7-Aminoactinomycin D.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Probe ist eine Körperflüssigkeit, die Granulozyten enthält. Von besonderem Vorteil ist, daß das erfindungsgemäße Verfahren auf Vollblut angewendet werden kann, ohne daß eine Zellisolierung von basophilen Granulozyten erforderlich ist. Bevorzugt ist für die Probe heparinisiertes Vollblut und sie stammt im Allgemeinen von einem Humanspender, obwohl auch andere Proben von Säugern wie etwa Nagern eingesetzt werden können.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist sehr einfach und schnell. Es kann an jedem handelsüblichen Durchflußcytometer durchgeführt werden, die in allen mittleren und größeren Krankenhäusern bzw. Labors vorhanden sind.

Die Verfahrensbedingungen können je nach verwendetem Testformat variiert werden. Als geeignete Bedingungen bei Verwendung von Fluoreszenzmarkierungen und einem durchflußzytometrischen Nachweis der Markierungen haben sich für Schritt (a), d. h. die Inkubation mit Testsubstanz, ein Zeitraum von 5 bis 60 Min. bevorzugt von 20 bis 40 Min. bei einer Temperatur von 25 bis 40°C, bevorzugt von 35 bis 39°C herausgestellt. Eine 30minütige Inkubation bei etwa 37°C ergibt gute Ergebnisse. Schritt (b) wird bevorzugt im Kalten durchgeführt, um eine unspezifische Degranulation zu vermeiden, wobei sich als geeignete Bedingungen eine Temperatur von 0 bis 10°C, bevorzugt eine Temperatur von 0 bis 5°C für eine Zeitdauer von 10 bis 40 Minuten, bevorzugt von 5 bis 30 Minuten herausgestellt haben.

Sofern nach Schritt (b) eine Fixierung durchgeführt wird, ist eine weitere Kühlung der Probe nicht essentiell, da durch die Fixierung eine weitere Degranulierung unterbunden wird. Schritt (c), d. h. die Bestimmung der Markierungen erfolgt im Anschluß an die Inkubationen sowie gegebenenfalls Lyse und nachfolgende Waschschritte. Dabei ist die Meßprobe für einen Zeitraum von mindestens einer Stunde, bevorzugt etwa zwei Stunden oder mehr, ausreichend stabil.

Wie für den Fachmann offensichtlich ist, werden bei einer Bestimmung nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zweckmäßig geeignete Kontrollen mitgeführt, wobei als Negativ-Kontrolle ein Ansatz ohne Testsubstanz und als Positiv-Kontrolle eine die Granulozyten aktivierende Substanz wie beispielsweise fMLP geeignet ist. Weiterhin ist es günstig, eine Probe mitzuführen, deren Werte im wesentlichen im Normbereich liegen, wie etwa eine Körperflüssigkeit eines gesunden Normalprobanden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Reagenzienkit zur Bestimmung der Degranulationsaktivität von basophilen Granulozyten in einer Probe. Der Reagenzienkit enthält ein erstes Bindemolekül, das mit zellständigen IgE-Antikörpern oder deren hochaffinen Rezeptoren bindefähig ist und ein zweites Bindemolekül, das mit einem Oberflächenmolekül, welches bei Degranulation de novo an der Oberfläche von basophilen Granulozyten erscheint, bindefähig ist, wobei das erste und das zweite Bindemolekül unterschiedliche nebeneinander nachweisbare Markierungsgruppen tragen oder jeweils mit unterschiedlichen nebeneinander nachweisbaren Markierungsgruppen bindefähig sind. Gegebenenfalls kann der Reagenzienkit als weitere Nachweisreagenzien ein drittes Bindemolekül enthalten, das z. B. mit dem CD45 Oberflächenmolekül bindefähig ist und eine neben den Markierungen des ersten und zweiten Bindemoleküls nachweisbare Markierungsgruppe trägt bzw. mit einer solchen Markierungsgruppe bindefähig ist. Außerdem kann der Reagenzienkit auch einen DNA-Farbstoff enthalten. Weitere optionale Bestandteile des Reagenzienkits sind Testsubstanzen, d.

h. verschiedene Allergene bzw. Positiv-Kontrollsubstanzen wie fMLP. Außerdem kann der Reagenzienkit auch noch Stimulantien wie Zytokine oder/und Reagenzien zur Lyse von Erythrozyten oder/und zur Fixierung von Leukozyten enthalten.

Weiterhin kann der Kit zusätzlich ein Reagenz zur Lyse von Erythrozyten oder/und zur Fixierung von Leukozyten sowie gegebenenfalls übliche Puffer, Hilfs- oder Zusatzstoffe enthalten.

Ein bevorzugter Reagenzienkit enthält beispielsweise mindestens eine Testsubstanz, einen anti-gp55-FITC-Antikörper, einen anti IgE-PE-Antikörper, eine FACS-Lysing Solution sowie gegebenenfalls 7-Aminoactinomycin D oder/und einen anti-CD45-PerCP-Antikörper und ein Stimulans wie etwa IL-3 oder GM-CSF.

Ein nochmals weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Diagnose von allergischer Hypersensitivität eines Patienten bzw. eines Hyposensibilisierungserfolgs, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man die Degranulationsaktivität von basophilen Granulozyten in einer Probe aus einem Patienten durch das erfindungsgemäße Verfahren unter Verwendung von einem oder mehreren Allergenen und einer Positivkontrolle als Testsubstanzen bestimmt, in einem weiteren Ansatz die Degranulationsaktivität in einer negativen Kontrollprobe bestimmt und das Vorhandensein oder die Abwesenheit einer allergischen Hypersensitivität bzw. den Erfolg oder Mißerfolg einer Hyposensibilisierungstherapie durch Vergleich der erhaltenen Werte ermittelt.

Als negative Kontrollprobe dient zweckmäßig eine Probe aus dem selben Patienten, der keine Testsubstanz gemäß Schritt (a) des erfindungsgemäßen Verfahrens zugesetzt wurde, und bevorzugt wird als zweite negative Kontrollprobe eine stimulierte Probe eines gesunden Normalprobanden mitgeführt.

Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung ist die Verwendung von anti-gp55-Antikörpern in einem Verfahren zur Bestimmung

von Degranulationsaktivität von basophilen Granulozyten sowie die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens bzw. Reagenzienkits bei der Diagnose von allergischer Hypersensitivität bzw. bei der Erfolgskontrolle einer Hyposensibilisierungstherapie.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird weiter erläutert durch die nachfolgenden Beispiele in Verbindung mit den beigefügten Abbildungen 1-6. Es zeigen:

Abb. 1: die Auswertung eines erfindungsgemäßen Tests für eine Negativkontrolle,

Abb. 2: die Auswertung eines erfindungsgemäßen Tests für eine Positivkontolle,

Abb. 3-5: einen Vergleich erfindungsgemäßen Tests mit einem Histamin-Release-Test des Standes der Technik und

Abb. 6: die Auswertung eines erfindungsgemäßen Tests bei Vorstimulation mit IL-3.

Beispiel 1

Peripheres Blut (heparinisiert) des Patienten wird mit unterschiedlichen Konzentrationen des suspekten Allergens bei 37°C inkubiert. Dadurch kommt es bei entsprechender Sensibilisierung zu einer Degranulation der basophilen Granulozyten und zu einer Aktivierung, die vor allem durch Expression des gp55-Antigens gekennzeichnet ist. Weiterhin sinkt die Expressionsdichte des IgE-Rezeptors und die Dichte von CD45 auf Basophilen steigt. Das Seitwärtsstreulicht steigt (Verlust der absorbierenden Granula) und die Anzahl der Basophilen im Streulichtgate für Lymphozyten verringert sich. Der Nachweis erfolgt durch eine Dreifarbimmunfluoreszenz und durchflußzytometrische Analyse. Als Positivkontrolle dient das chemotaktische Peptid fMLP, als Negativkontrolle Pufferlösung (PBS). Die Einnahme von Antihistaminika hemmt den Test.

1. Materialien

1.1 Reagenzien

Sheathflüssikgeit: FACS-Flow (Fa. Becton Dickinson, Best-Nr. 342003) oder eine andere Trägerflüssigkeit mit niedriger Eigenfluoreszenz.

FACS-Lysing Solution, 10x-Konzentrat (Fa. Becton Dickinson, Best-Nr. 349202),

Waschlösung: PBS (Phosphate buffered saline ohne Calcium und Magnesium) als fertige Lösung oder Salze (z.B. Biochrom, Berlin), oder PHAGO-BURST Waschlösung (Fa. ORPEGEN Pharma, Heidelberg).

Chemotaktisches Peptid
fMLP (2000x) (Fa. ORPEGEN), in PBS verdünnen.

Zur Kalibration bei quantitativen Messungen:
Calibrite Eichpartikel, Becton Dickinson, Best-Nr.: 349502

1.2 Monoklonale Antikörper

a) anti gp55-FITC, (ORPEGEN Pharma), Bestell-Nr. 1464 (in der fertigen Kombination 1:4 vorverdünnt)
b) anti IgE-PE (ORPEGEN Pharma), Bestell-Nr. 1465 (in der fertigen Kombination 1:40 vorverdünnt)
c) anti CD45 PerCP (Becton-Dickinson) oder CD45-Cychrome (Pharmingen), Bestell-Nr.

1.3 Allergene

ALK-Depot SQ (Scherax) 6-Gräsermischung + Roggen 100.000 U/ml, Bestell-Nr. 145a/90.90c
Latex Allergen (ALYOSTAL ST-IR) Bestell-Nr. 0903
ALK-prick SQ (Scherax) Bienengift, Zul.-Nr. 222a/85a, 300µg/ml

ALK-prick SQ (Scherax) Wespengift, Zul.-Nr. 223a/85a, 300µg/ml
Allergopen (Penicillin G, PPL und Derviat MDM), Zul.-Nr. 162a/81,
Penicillin "Grünenthal" 1 Mega, PZN-7803133
Milbenallergen der Firma Geer-Labs u.a.m.

2. Durchführung

2.1 Probenvorbereitung

Die zu untersuchende Probe wird in Aliquots von jeweils 100 µl aufgeteilt. Bei höheren Leukozytenzahlen (WBC von 10-20000 Z/µl) kann ein geringeres Probenvolumen z. B. 50 µl verwendet werden. Mehrfachansätze sind nicht erforderlich.

2.2 Vorbereitung der Allergenverdünnungen

ALK-Depot SQ (Scherax) 6-Gräsermischung + Roggen wird in Konzentrationen von 10.000, 1.000, 100 und 10 U/ml eingesetzt. ALK-prick SC (Scherax) Bienengift und ALK-prick SQ (Scherax) Wespengift werden in Konzentrationenen von 10, 1, 0,1 und 0,01 µg/ml eingesetzt. Latexallergen, PPL (Allergopen) und MDM (Allergopen) werden in Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1.000 eingesetzt. Penicillin Grünenthal wird in Konzentrationen von 100, 10, 1 und 0,1 µg/ml eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle dient PBS und als Positivkontrolle wird fMLP in einer Konzentration von 10^{-7} M (d.h. 1:2.000 PBS) verwendet. Als weitere Kontrolle wird eine Probe aus einem gesunden Normalprobanden mitgeführt.

2.3 Inkubation mit Allergen

Je 100 µl der Allergenverdünnung werden zu einem Aliquot der Probe gegeben, gemischt und 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Dann werden die Ansätze auf Eis gestellt.

2.4 Zugabe der Antikörper

Dann werden folgende Antikörperlösungen zugegeben.

a) 20 µl anti gp55-FITC (vorverdünnt)

b) 20 µl anti IgE-PE (vorverdünnt)

c) 10 µl anti CD45-Cychrome bzw. 20 µl CD45-PerCP

Nach der Antikörperzugabe wird gut gemischt (Vortex) und für 20 Minuten lichtgeschützt auf Eis inkubiert.

2.5 Lyse und Fixierung

Dann erfolgt eine Zugabe von 2 ml FACS-Lysing-Solution (Erythrozytenlyse und Leukozytenfixation), Mischen (VORTEX) und Inkubation 10 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Anschließend wird 5 min bei 1300 U/min bzw. 300 g abzentrifugiert und dekantiert.

2.6 Waschen der Zellen

Das Waschen der Zellen erfolgt durch Zugabe von 3 ml Waschlösung (PBS), Abzentrifugieren (5 min 1300 U/min bzw. 300 g) und Dekantieren.

2.7 Messung

Die Messung der Probe erfolgt durchflußzytometrisch, z. B. an einem FACScan Gerät. Die Stabilität der Meßprobe berägt vermutlich ≥ 2 Stunden auf Flockeneis im Dunkeln.

Die Geräteeinstellung ("BASO-SET" im Programm CellQuest®) kann wie folgt gewählt werden.

Parameter	Verstärker	Erwartungswert	Auflösung
FSC	lin	E00 (2,0)	256 Kanäle
SSC	lin	360	256 Kanäle
FL1	log, 4 Dekaden	620	256 Kanäle
FL2	log, 4 Dekaden	500	256 Kanäle
FL3	log, 4 Dekaden	620	256 Kanäle
Trigger auf FSC		100	
Kompensation	FL1 - %FL2	0,9	
	FL2 - %FL1	21	
	FL2 - %FL3	0,2	
	FL3 - %FL2	29	

- Filterkombinationen (im FACScan nicht variabel):

Parameter:		Spektrum	Fluorochrom	Filter
FL1	Fluoreszenz 1	Grünfluoreszenz	FITC, TO	BP 530 +/- 15 nm
FL2	Fluoreszenz 2	Orangefluoreszenz	PE, PI	BP 585 +/- 22 nm
FL3	Fluoreszenz 3	Rotfluoreszenz	PerCP, Red613, Cy5, PI	LP > 650 nm

Es wird im Dotplot SSC/IgE eine Region um die Zellen mit geringem und hohem Seitwärtsstreulicht und starker IgE-Expression gesetzt. Diese Zellen werden optional im Rahmen der Validierung im Dotplot FL3 (CD45) vs FL2 (IgE) dargestellt und die x- bzw. y-Meanwerte dieser Population ausgewertet, weiterhin das FL1-Histogramm (gp55). Die Marker werden so gesetzt, daß die Auswerteregion den Bereich der gp55 positiven Basophilen erfasst (als Negativkontrolle dient der PBS Ansatz). Der Meanwert FL1 wird von allen (auch gp55 negativen) Zellpopulationen betrachtet. Es werden mög-lichst mindestens 1.000 Zellen von der interessierenden Subklasse (hier: Basophile) aufgenommen. Im positiven Ansatz entsteht eine bimodale Verteilung, in der die aktivierten basophilen Granulozyten eine eigene Population darstellen. Es kann daher der prozentuale Anteil betrachtet werden, was für die Bewertung des Testergenisses ausreichend ist.

3. Auswertung

Die Auswertung für eine Negativkontrolle mit PBS ist in Abb. 1 dargestellt. Die Auswertung für eine Positivkontrolle mit fMLP ist in Abb. 2 dargestellt.

Die nachstehende Tabelle 1 zeigt typische Werte, wobei aus Plausibilitätsgründen alle Parameter zu berücksichtigen sind. Ein Vergleich zwischen Negativkontrolle (PBS) und Positivkontrolle (fMLP) zeigt, daß der Prozentsatz der Basophilen im wesentlichen stabil bleibt, die CD45 Expressionsdichte nach Aktivierung steigt und die IgE-Dichte leicht sinkt. Der Prozentsatz der gp55 positiven basophilen Granulozyen sowie der Mean gp55 Wert nimmt nach Aktivierung stark zu.

Ansatz	%Basos	Mean CD45	Mean IgE	%gp55	Mean gp55
PBS	2,50	134	1032	3,3	33
fMLP	2,35	349	981	30,6	369

Ein Vergleich der Diagramme für CD 45 und gp55 bei der Positiv- und Negativkontrolle zeigt, daß für gp55 eine deutlich höhere allergenspezifisch induzierte Erhöhung der Expression stattfindet.

In den Abb. 3-6 sind Resultate des erfindungsgemäßen Verfahrens dargestellt. Abb. 3 zeigt einen Verlgeich des erfindungsgemäßen Verfahrens (gp55 bzw. CD63-Expression) mit dem herkömmlichen Histamin-Release-Test bei der Bestimmung einer Gräserpollenallergie. Entsprechende Daten sind in Abb. 4 für die Bestimmung einer Bienengiftallergie bzw. in Abb. 5 für die Bestimmung einer Wespengiftallergie gezeigt. Aus Abb. 6 ist am Beispiel einer Latexallergenbestimmung ersichtlich, daß durch Vorstimulation mit einem Zytokin wie IL-3 die Degranulationsaktivität der Basophilen deutlich verstärkt werden kann.

Legende:

FSC = forward light scatter = narrow angle forward light scatter = Zellgröße

SSC = side scatter = orthogonal light scatter = Zellgranularität

algE-PE = IgE-PE = monoklonaler Antikörper gegen das Immunglobulin E, direkt konjugiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin.

gp55-FITC = monoklonaler Antikörper gegen das lysosomale Glykoprotein mit dem Molekulargewicht 55 kD, direkt konjugiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein.

CD45 CyChrome = monoklonaler Antikörper gegen das gemeinsame Zelloberflächen-Glykoprotein von Leukozyten, direkt konjugiert mit dem Tandemfarbstoff PE-Cyanin 5

R1, R2, R3 = Regionen in denen bestimmte Zellen liegen und die als logisches Gate funktionieren. In diesem Falle die typischen Regionen für basophile Granulozyten

M1 = Markerregion in der die für das Antigen gp55 positiv reagierenden Zellen liegen (degranulierte Basophile)

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Degranulationsaktivität von basophilen Granulozyten in einer Probe,
dadurch gekennzeichnet,
daß man
 (a) die Probe mit einer Testsubstanz vermischt und inkubiert,
 (b) die Probe mit einem ersten Bindemolekül, das mit zellständigen IgE Antikörpern oder deren hochaffinen Rezeptoren bindefähig ist, und einem zweiten Bindemolekül, das mit einem Oberflächenmolekül, welches bei Degranulation de novo an der Oberfläche von basophilen Granulozyten erscheint, bindefähig ist, vermischt und inkubiert, wobei das erste Bindemolekül und das zweite Bindemolekül unterschiedliche nebeneinander nachweisbare Markierungsgruppen tragen oder jeweils mit unterschiedlichen nebeneinander nachweisbaren Markierungsgruppen bindefähig sind, und
 (c) die Markierungen der Bindemoleküle separat bestimmt und auf Basis dieser Bestimmung die Degranulationsaktivität in der Probe qualitativ oder/und quantitativ ermittelt.

2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Probe mit einem die Degranulationsaktivität verstärkenden Stimulans vorinkubiert.

3. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als Stimulans ein Zytokin, insbesondere IL-3 oder GM-CSF nimmt.

4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als erstes Bindemolekül oder/und als zweites Bindemolekül einen Antikörper oder ein Antikörperfragment verwendet.

5. Verfahren nach einen der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als erstes Bindemolekül einen anti-IgE-Antikörper oder ein Fragment davon oder einen anti-Fc_ϵ R1-Antikörper oder ein Fragment davon verwendet.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als zweites Bindemolekül einen anti-gp55-Antikörper oder ein Fragment davon verwendet.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man vor Schritt (c) Erythrozyten lysiert oder/und Leukozyten fixiert.

8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß man nach Fixierung einen Waschschritt durchführt.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Probe zusätzlich mit einem dritten Bindemolekül inkubiert, das mit dem Oberflächenmolekül CD45 bindefähig ist, wobei das dritte Bindemolekül eine Markierungsgruppe trägt oder mit einer Markierungsgruppe bindefähig ist, die separat neben den Markierungsgruppen des ersten und zweiten Bindemoleküls nachweisbar ist.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,

daß man direkt markierte Bindemoleküle verwendet.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Bindemoleküle nebeneinander nachweisbare Fluoreszenzmarkierungen tragen.

12. Verfahren nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet,** daß man die Bestimmung in einem Durchflußzytometer durchführt.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet,** daß man die Probe zusätzlich mit einem DNA-Farbstoff, der neben den Markierungen der Bindemoleküle nachweisbar ist, inkubiert.

14. Verfahren nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet,** daß der DNA-Farbstoff ein Fluoreszenzfarbstoff ist.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß der fluoreszierende DNA-Farbstoff 7-Aminoactinomycin D ist.

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Probe Vollblut ist.

17. Verfahren nach Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Probe heparinisiertes Vollblut ist.

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet,**

daß die Probe eine Humanprobe ist.

19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet,** daß man die Inkubation von Schritt (a) während 5-60 min bei einer Temperatur von 25-40°C durchführt.

20. Verfahren nach Anspruch 19, **dadurch gekennzeichnet,** daß man die Inkubation von Schritt (a) während 20-40 min bei 35-39°C durchführt.

21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet,** daß man die Inkubation von Schritt (b) während 10-40 min bei einer Temperatur von 0-10°C durchführt.

22. Reagenzienkit zur Bestimmung der Degranulationsaktivität von basophilen Granulozyten, **dadurch gekennzeichnet,** daß er mindestens ein erstes Bindemolekül, das mit zellständigen IgE-Antikörpern bindefähig ist, und ein zweites Bindemolekül, das mit einem Oberflächenmolekül, welches bei Degranulation de novo an der Oberfläche von basophilen Granulozyten erscheint, bindefähig ist, enthält, wobei das erste und das zweite Bindemolekül unterschiedliche nebeneinander nachweisbare Markierungsgruppen tragen oder jeweils mit unterschiedlichen nebeneinander nachweisbaren Markierungsgruppen bindefähig sind.

23. Reagenzienkit nach Anspruch 22, **dadurch gekennzeichnet,** daß er zusätzlich ein drittes Bindemolekül enthält, das mit dem CD45-Oberflächenmolekül bindefähig ist, wobei das dritte Bindemolekül eine mit den Markierungsgruppen des ersten und zweiten Bindemoleküls nachweisbare Markierungsgruppe trägt oder damit bindefähig ist.

24. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 22 oder 23, **dadurch gekennzeichnet,** daß er zusätzlich einen DNA-Farbstoff enthält.

25. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 20 bis 24, **dadurch gekennzeichnet,** daß er zusätzlich Reagenz zur Lyse von Erythrozyten oder/und zur Fixierung von Leukozyten enthält.

26. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 22 bis 25, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Markierungen Fluoreszenzmarkierungen sind.

27. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 22 bis 26, **dadurch gekennzeichnet,** daß er mindestens eine Testsubstanz, einen anti-gp55-FITC Antikörper, anti-IgE-PE Antikörper, FACS-Lysing Solution sowie gegebnenfalls 7-Aminoactinomycin D oder/und einen anti-CD45-PerCP Antikörper oder/und ein Stimulans enthält.

28. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 22 bis 27, **dadurch gekennzeichnet,** daß er weiterhin übliche Puffer, Hilfs- oder/und Zusatzstoffe enthält.

29. Verfahren zur Diagnose von allergischer Hypersensitivität eines Patienten, bzw. eines Hyposensibilisierungserfolgs, **dadurch gekennzeichnet,** daß man die Degranulationsaktivität von basophilen Granulozyten in einer Probe aus dem Patienten durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21 unter Verwendung von einem oder mehreren Allergenen und einer Positivkontrolle als Testsubstanzen bestimmt, in einem weiteren Ansatz die Degranulationsaktivität in einer negativen Kontrollprobe bestimmt und das Vorhandensein oder die Abwesenheit einer Hypersensitivität bzw. den Erfolg oder

den Mißerfolg einer Hyposensibilisierungstherapie durch Vergleich der erhaltenen Werte ermittelt.

30. Verwendung von anti-gp55 Antikörpern in einem Verfahren zur Bestimmung der Degranulationsaktivität von basophilen Granulozyten.

31. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 21 bei der Diagnose von allergischer Hypersensitivität.

32. Verwendung eines Reagenzienkits nach einem der Ansprüche 22 bis 28 bei der Diagnose von allergischer Hypersensitivität.

33. Verwendung eine Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 21 bei der Erfolgskontrolle einer Hyposensibilisierungstherapie.

34. Verwendung eine Reagenzienkits nach einem der Ansprüche 1 bis 28 bei der Erfolgskontrolle einer Hyposensibilisierungstherapie.

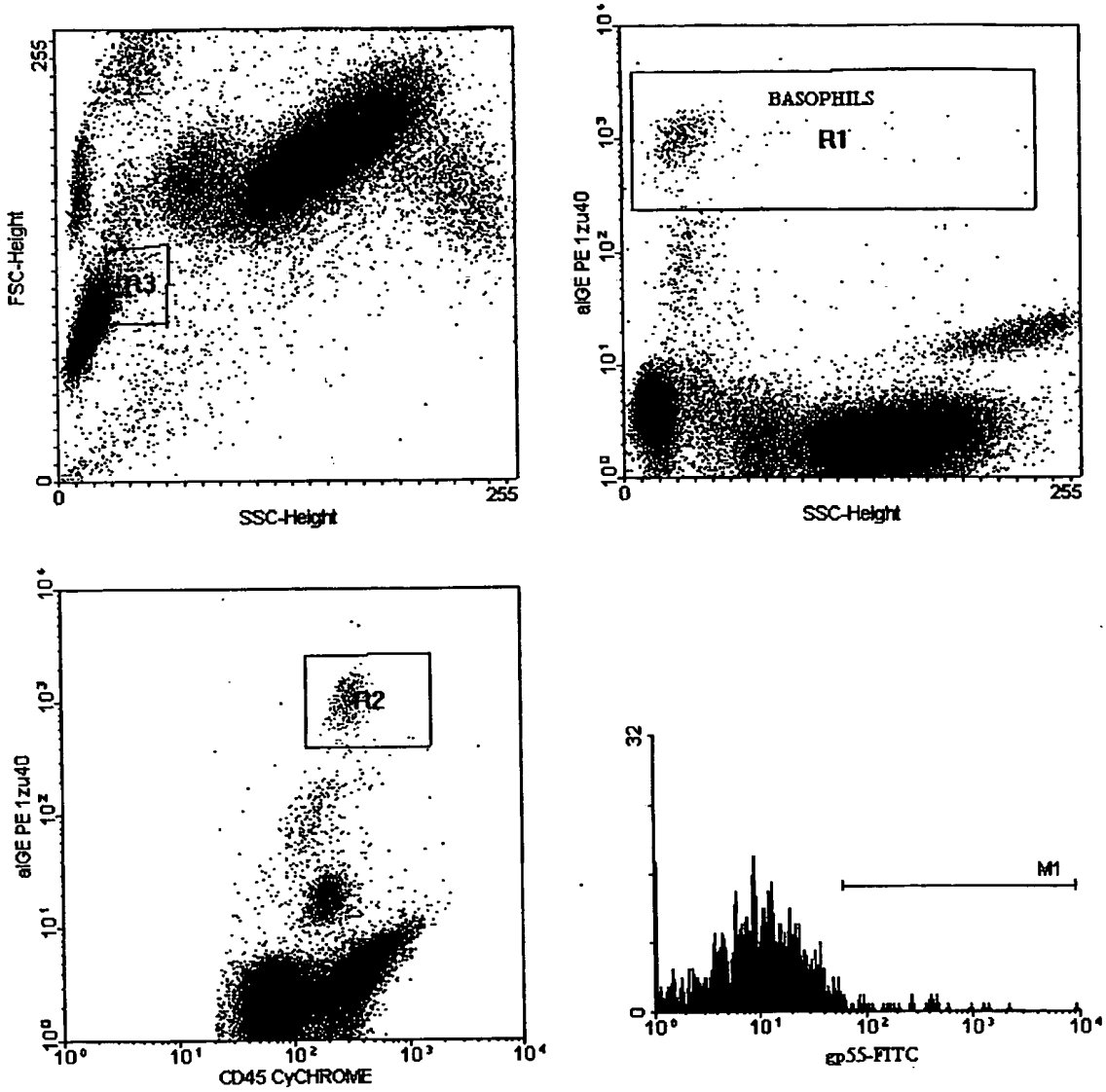

FSC-Height
SSC-Height
R3
BASOPHILS
R1
aIGE PE 1zu40
SSC-Height
R2
aIGE PE 1zu40
CD45 CyCHROME
M1
CD55-FITC

Fig. 1

Fig. 2

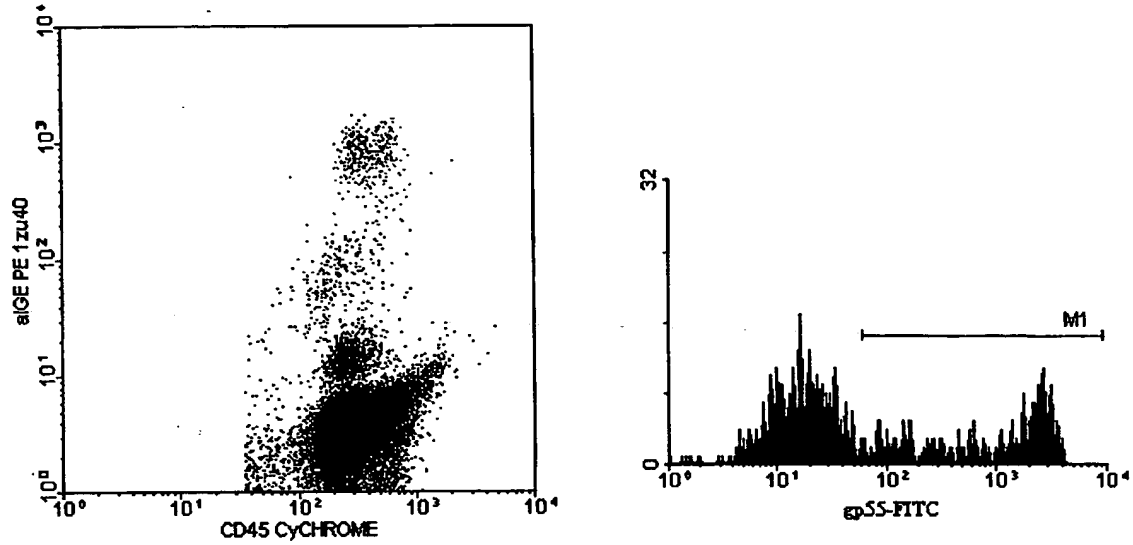
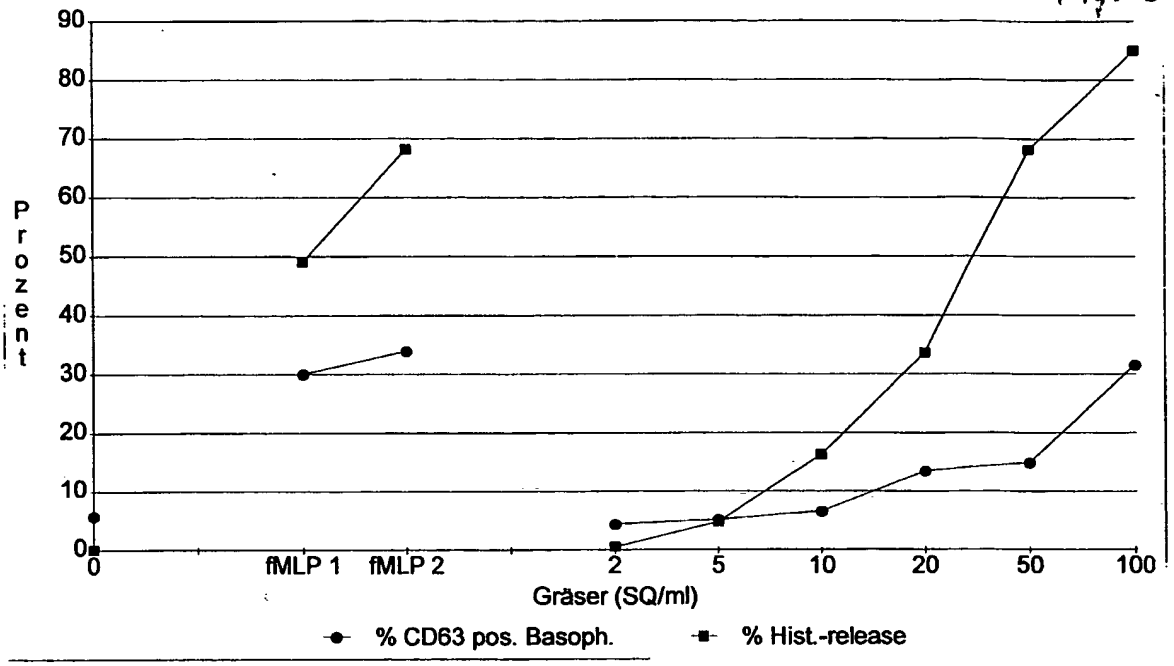


Fig. 3



Vergleich gp55-Expression (Zytometrie) mit Histamin-ELISA bei Insektengiftallergie

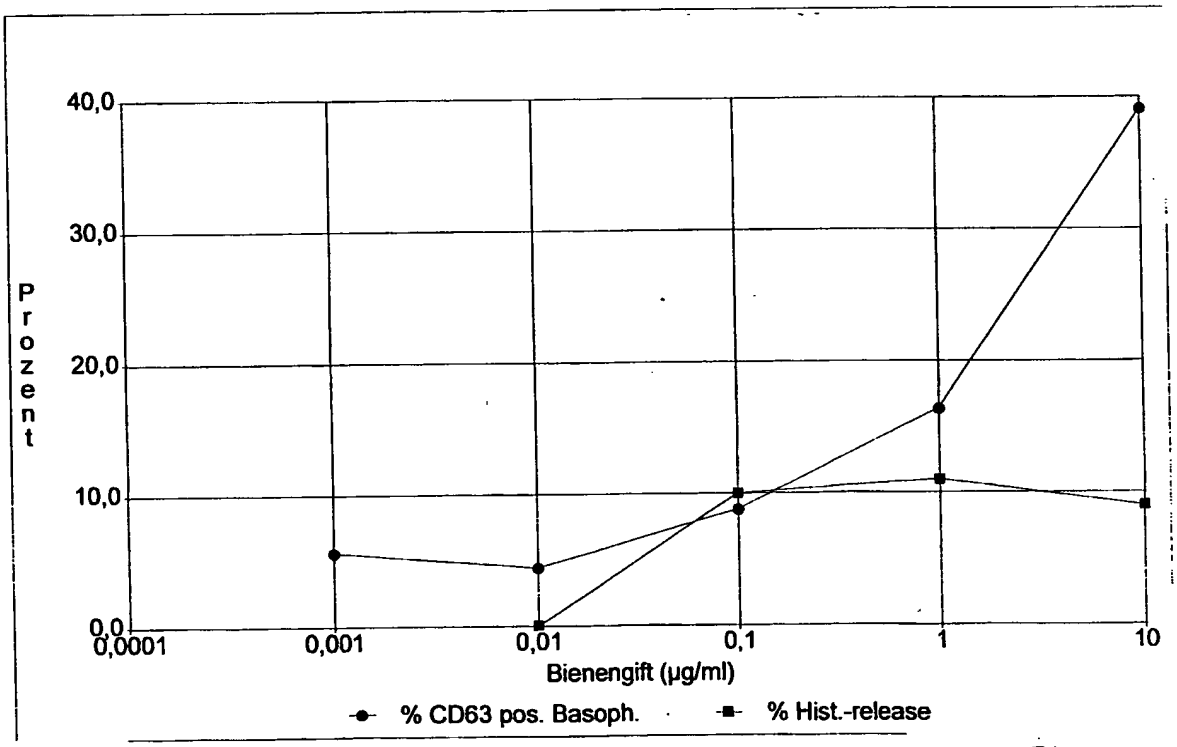
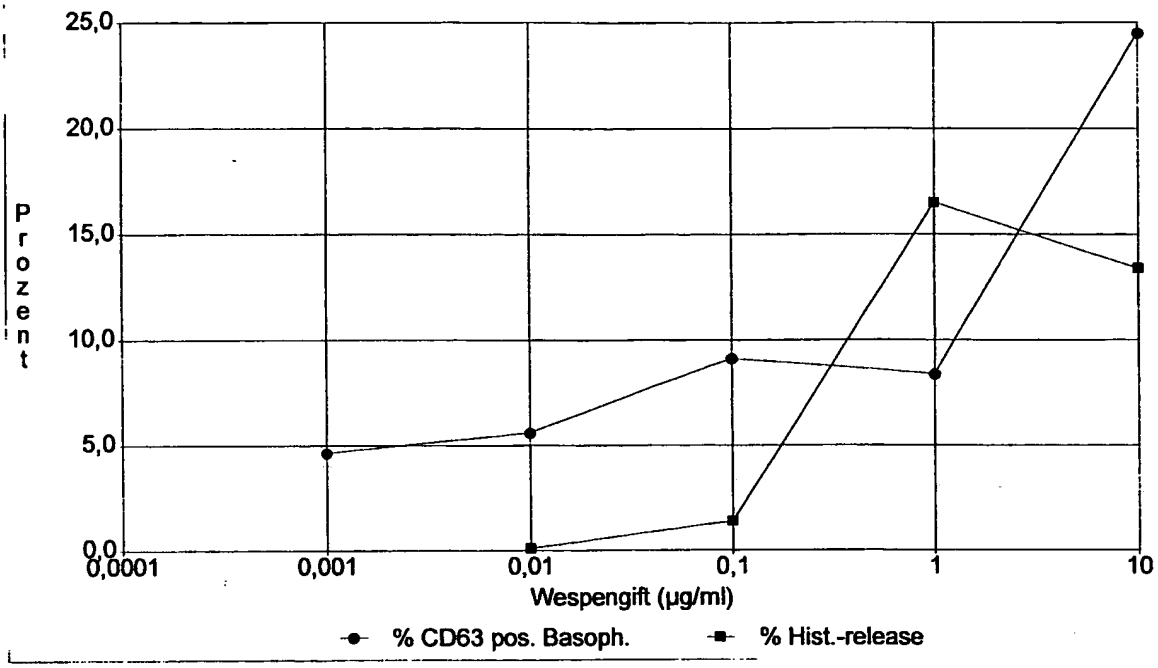
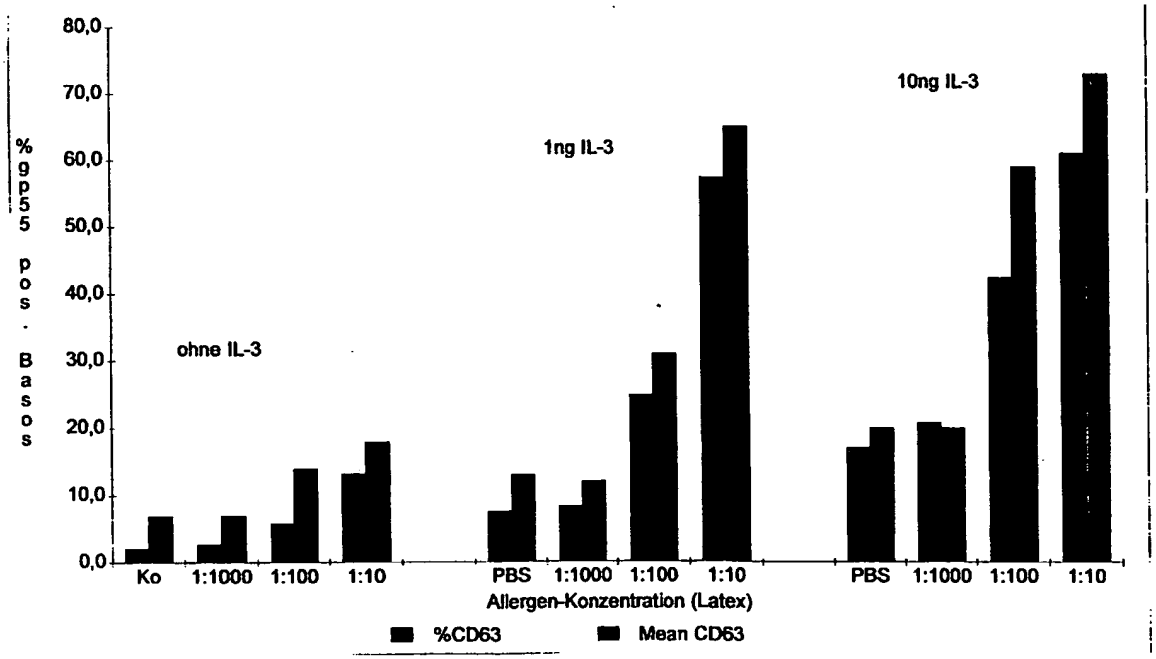


Fig. 4


25,0
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
Prozent
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
Wespengift (µg/ml)
% CD63 pos. Basoph.
% Hist.-release


80,0
70,0
60,0
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
%gp55 pos. Basos
ohne IL-3
1ng IL-3
10ng IL-3
Ko
1:1000
1:100
1:10
PBS
1:1000
1:100
1:10
PBS
1:1000
1:100
1:10
Allergen-Konzentration (Latex)
%CD63
Mean CD63

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No
PCT/EP 97/00251

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N33/50 G01N33/68 G01N33/566 G01N33/58 G01N1/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 84 04109 A (BIO-INSTRUCTA LABKONSULT) 25 October 1984 ---	
A	WO 93 25904 A (NUTRON LIMITED) 23 December 1993 ---	
A	WO 95 15494 A (NUTRON LIMITED) 8 June 1995 ---	
A	EP 0 185 335 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH.) 25 June 1986 ---	
A	FR 2 467 401 A (A. L. DE WECK) 17 April 1981 ---	
A	EP 0 022 698 A (INSTITUT PASTEUR) 21 January 1981 -----	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 September 1997	06 -10- 1997

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Griffith, G

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 97/00251

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8404109 A	25-10-84	SE 461660 B	12-03-90
		AU 2866884 A	07-11-84
		EP 0172822 A	05-03-86
		JP 61500275 T	20-02-86
		SE 8302190 A	20-10-84
		US 4812402 A	14-03-89
WO 9325904 A	23-12-93	AU 4341693 A	04-01-94
		CA 2137160 A	23-12-93
		EP 0643831 A	22-03-95
		JP 8500437 T	16-01-96
WO 9515494 A	08-06-95	AU 1194395 A	19-06-95
		ZA 9409488 A	14-08-95
EP 185335 A	25-06-86	DE 3446714 A	26-06-86
		AU 596087 B	26-04-90
		AU 5126685 A	26-06-86
		CA 1265742 A,C	13-02-90
		JP 1903828 C	08-02-95
		JP 6030633 B	27-04-94
		JP 61155861 A	15-07-86
		US 5116731 A	26-05-92
FR 2467401 A	17-04-81	NONE	
EP 22698 A	21-01-81	FR 2460481 A	23-01-81
		FR 2483621 A	04-12-81
		CA 1166566 A	01-05-84
		OA 6560 A	31-07-81
		US 4640897 A	03-02-87

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 97/00251

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 G01N33/50 G01N33/68 G01N33/566 G01N33/58 G01N1/30

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 84 04109 A (BIO-INSTRUCTA LABKONSULT) 25.Oktober 1984 ---	
A	WO 93 25904 A (NUTRON LIMITED) 23.Dezember 1993 ---	
A	WO 95 15494 A (NUTRON LIMITED) 8.Juni 1995 ---	
A	EP 0 185 335 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH.) 25.Juni 1986 ---	
A	FR 2 467 401 A (A. L. DE WECK) 17.April 1981 ---	
A	EP 0 022 698 A (INSTITUT PASTEUR) 21.Januar 1981 -----	

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zumVerständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
23.September 1997	06 -10- 1997

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Griffith, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffen ..ngen, die zur selben Patentfamilie gehören

nationales Aktenzeichen
PCT/EP 97/00251

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 8404109 A	25-10-84	SE 461660 B	12-03-90
		AU 2866884 A	07-11-84
		EP 0172822 A	05-03-86
		JP 61500275 T	20-02-86
		SE 8302190 A	20-10-84
		US 4812402 A	14-03-89
WO 9325904 A	23-12-93	AU 4341693 A	04-01-94
		CA 2137160 A	23-12-93
		EP 0643831 A	22-03-95
		JP 8500437 T	16-01-96
WO 9515494 A	08-06-95	AU 1194395 A	19-06-95
		ZA 9409488 A	14-08-95
EP 185335 A	25-06-86	DE 3446714 A	26-06-86
		AU 596087 B	26-04-90
		AU 5126685 A	26-06-86
		CA 1265742 A,C	13-02-90
		JP 1903828 C	08-02-95
		JP 6030633 B	27-04-94
		JP 61155861 A	15-07-86
		US 5116731 A	26-05-92
FR 2467401 A	17-04-81	KEINE	
EP 22698 A	21-01-81	FR 2460481 A	23-01-81
		FR 2483621 A	04-12-81
		CA 1166566 A	01-05-84
		OA 6560 A	31-07-81
		US 4640897 A	03-02-87